



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 102 09 821 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 07 K 2/00**  
A 61 K 38/43

⑳ Aktenzeichen: 102 09 821.2  
㉔ Anmeldetag: 6. 3. 2002  
㉕ Offenlegungstag: 25. 9. 2003

**DE 102 09 821 A 1**

⑦① **Anmelder:**

Biotechnologie Gesellschaft Mittelhessen mbH,  
35394 Gießen, DE

⑦④ **Vertreter:**

Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,  
80538 München

⑦② **Erfinder:**

Hemberger, Jürgen, Prof. Dr., 63741 Aschaffenburg,  
DE; Orlando, Michele, Dr., 35394 Gießen, DE

⑤⑥ **Entgegenhaltungen:**

DE	196 28 705 A1
DE	101 12 825 A1
US	52 18 108 A

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ **Kopplung von Proteinen an ein modifiziertes Polysaccharid**

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft die Kopplung von Proteinen an ein von Stärke abgeleitetes modifiziertes Polysaccharid, wobei die bindende Wechselwirkung zwischen dem modifizierten Polysaccharid und dem Protein auf einer kovalenten Bindung beruht, welche das Ergebnis einer Kopplungsreaktion zwischen der endständigen Aldehydgruppe oder einer aus dieser Aldehydgruppe durch chemische Umsetzung hervorgegangenen funktionellen Gruppe des modifizierten Polysaccharidmoleküls und einer mit dieser Aldehydgruppe oder daraus hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Polysaccharidmoleküls reaktionsfähigen funktionellen Gruppe des Proteins ist, wobei die bei der Kopplungsreaktion unmittelbar resultierende Bindung gegebenenfalls durch eine weitere Reaktion zur obengenannten kovalenten Bindung modifiziert sein kann. Die Erfindung betrifft ferner pharmazeutische Zusammensetzungen, welche die bei der Kopplung gebildeten Konjugate umfassen, und die Verwendung dieser Konjugate und Zusammensetzungen zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

**DE 102 09 821 A 1**

[0001] Die schnelle Entwicklung der Gentechnik in den letzten Jahrzehnten hat dazu geführt, dass eine Vielzahl von Genen für Proteine mit potentiell therapeutischem Nutzen identifiziert wurden und die entsprechenden Genprodukte mit Hilfe biologischer Expressionssysteme unschwer rein oder annähernd rein in größeren Mengen hergestellt werden können.

[0002] Es stellte sich jedoch heraus, dass der praktische Einsatz solcher Proteine, z. B. in der Diagnostik, der Therapie und bei Biotransformationen, häufig auf Schwierigkeiten stößt, da deren Stabilitäts- und Löslichkeitseigenschaften, insbesondere bei physiologischen pH-Werten, oft unbefriedigend sind. Zwei Beispiele für solche Proteine sind der Tumornekrosefaktor TNF- $\alpha$  oder Interleukin-2.

[0003] Löslichkeitsprobleme treten zudem sehr häufig bei der Expression von Glycoproteinen in prokaryotischen Systemen wie *E. coli* auf, da diese dann ohne die natürliche Glycosylierung exprimiert werden, was zum Teil eine erheblich verminderte Löslichkeit zur Folge hat. Dies kann den Einsatz von wesentlich teureren eukaryotischen Expressionssystemen erforderlich machen.

[0004] Beim therapeutischen Einsatz im Körper werden viele Proteine sehr schnell aus dem Blutkreislauf entfernt oder abgebaut. Systemisch applizierte Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als etwa 70 kD können durch das reticuloendotheliale System oder spezifische Wechselwirkungen mit zellulären Rezeptoren dem Kreislauf entzogen werden. Kleinere Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als etwa 70 kD können überdies in großem Umfang durch die glomeruläre Filtration in der Niere (Ausschlussgrenze etwa 70 kD) entfernt werden.

[0005] Ein in jüngerer Zeit verfolgter Ansatz zur Behebung der geschilderten Probleme besteht in der Kopplung solcher problematischen Proteine mit gut wasserlöslichen biokompatiblen Polymeren, wie z. B. Polyethylenglycol und Dextran. Durch die Kopplung läßt sich einerseits das Molekulargewicht über den Schwellenwert von 70 kD hinaus erhöhen, so dass die Plasma-Verweilzeit kleinerer Proteine drastisch gesteigert werden kann, andererseits kann durch den hydrophilen Polymeranteil die Löslichkeit im wässrigen Milieu verbessert werden.

[0006] Weitere, meist günstige Wirkungen, die mit der Kopplung von Proteinen mit solchen Polymeren verbunden sein können, beruhen auf der Maskierung von Proteaserkennungsstellen und antigenen Determinanten auf dem Proteinmolekül durch das gebundene Polymer. Dadurch können die therapeutischen Proteine zum einen weitgehend dem proteolytischen Abbau entzogen werden, zum anderen ist die Auslösung allergener Reaktionen durch das körperfremde therapeutische Protein weitgehend unterdrückt. Über die Molekulargewichtserhöhung hinaus werden Proteine so durch die Anwesenheit eines Polymers vor enzymatischem Abbau und zudem oft vor thermischer Denaturierung geschützt. In vielen Fällen erhöht sich dadurch die Stabilität und in vivo-Halbwertszeit der Proteine deutlich bzw. sinkt die Immunogenität und Antigenität.

[0007] Bisher wurden die meisten Modifizierungen mit Polyethylenglycol oder Dextran durchgeführt, wobei PEG generell bevorzugt wird, da es einfachere Produkte ergibt.

[0008] Dextran-Kopplungen wurden nur für einige wenige Proteine beschrieben, wie z. B. Streptokinase, Plasmin, Hämoglobin oder Aprotinin. Dextran-Konjugate zeigen jedoch oft hohe Allergenität, vermutlich verursacht durch Abbauprodukte des Dextrans, eine geringe metabolische Stabilität und in vielen Fällen geringe Ausbeuten bei den Kopplungsreaktionen. Dies hat dazu geführt, dass bisher keines

dieser Dextran-Kopplungsprodukte für die therapeutische Anwendung an Mensch oder Tier zugelassen wurde.

[0009] Derivatisierungen mit PEG wurden wesentlich häufiger durchgeführt, so dass diese Methode heute als Standard für die Molekulargewichtsvergrößerung von Proteinen angesehen werden kann. Einige dieser Derivate befinden sich in verschiedenen Phasen der klinischen Versuche bzw. sind bereits in den USA zugelassen. In Phase III befindet sich PEG-Hämoglobin sowie ein PEG-Addukt der Superoxiddismutase (SOD), das hinsichtlich Polymerkopplungen als das am besten untersuchte Protein gilt. PEG-gekoppelte Asparaginase wird bereits in der Therapie der akuten lymphozytischen Leukämie eingesetzt. In 2001 wurde PEG-Interferon- $\alpha$  zur Behandlung von Hepatitis-C-Patienten zugelassen.

[0010] Beim Einsatz dieser PEG-Konjugate wurde jedoch auch über unangenehme bis gefährliche Nebenwirkungen wie Juckreiz, Überempfindlichkeitsreaktionen und Pankreatitis berichtet. Ferner ist die biologische Aktivität der Proteine nach der PEG-Kopplung oft sehr gering und der Metabolismus der Abbauprodukte von PEG-Konjugaten ist noch weitgehend unbekannt und stellt möglicherweise ein Gesundheitsrisiko dar.

[0011] WO 99/49897 beschreibt Konjugate von Hämoglobin, welche durch Umsetzung der Aldehydgruppen von oxidativ ringgeöffneten Polysacchariden wie Hydroxyethylstärke oder Dextran mit primären Amingruppen des Proteins gebildet werden. Dabei wirken die eingesetzten Polysaccharide jedoch als polyfunktionelle Reagenzien, die ein sehr heterogenes Produktgemisch mit schwer einstellbaren Eigenschaften ergeben.

[0012] US-Patent 6,083,909 beschreibt ein Verfahren zur Kopplung von selektiv oxidierten Hydroxyethylstärke an Hämoglobin in DMSO. Unsere Untersuchungen zeigten jedoch, daß das gewünschte Produkt unter den angegebenen Bedingungen nicht erhalten wird, da Hämoglobin in DMSO denaturiert und damit seine biologische Aktivität verliert.

[0013] Es besteht somit nach wie vor Bedarf an physiologisch gut verträglichen Alternativen zu Dextran- oder PEG-gekoppelten Proteinen, mit denen die Löslichkeit von Proteinen verbessert oder die Verweildauer der Proteine im Plasma erhöht werden kann.

[0014] Aufgabe der Erfindung ist es daher, solche Alternativen bereitzustellen und einfache und effiziente Verfahren zur Herstellung solcher alternativer Proteinderivate zu entwickeln.

[0015] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugate gelöst, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass die bindende Wechselwirkung zwischen dem Hydroxyalkylstärkemolekül und dem Protein auf einer kovalenten Bindung beruht, welche das Ergebnis einer Kopplungsreaktion zwischen der endständigen Aldehydgruppe oder einer aus dieser Aldehydgruppe durch chemische Umsetzung hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls und einer mit dieser Aldehydgruppe oder daraus hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls reaktionsfähigen funktionellen Gruppe des Proteins ist, wobei die bei der Kopplungsreaktion unmittelbar resultierende Bindung gegebenenfalls durch eine weitere Reaktion zur obengenannten kovalenten Bindung modifiziert sein kann.

[0016] Die Erfindung umfasst ferner pharmazeutische Zusammensetzungen, welche diese Konjugate enthalten, sowie die Verwendung dieser Konjugate und Zusammensetzungen zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers sowie Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate und Zusammensetzungen.

[0017] Überraschend wurde gefunden, dass sich die oben

beschriebenen Reaktionen bei geeigneter Wahl der Bedingungen in wässriger Lösung durchführen lassen, wodurch die biologische Aktivität der Proteine in vielen Fällen vollständig oder teilweise erhalten werden kann.

[0018] Das wässrige Reaktionsmedium für die Kopplungsreaktion ist dabei vorzugsweise Wasser oder eine Mischung aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel, wobei der Wasseranteil in der Mischung mindestens etwa 70 Gew.-%, vorzugsweise mindestens etwa 80 Gew.-%, noch bevorzugter mindestens etwa 90 Gew.-% beträgt.

[0019] Das Molverhältnis von Hydroxyalkylstärke (HAS) zu Protein bei der Kopplungsreaktion beträgt gewöhnlich etwa 20 : 1 bis 1 : 1, vorzugsweise etwa 5 : 1 bis 1 : 1.

[0020] Die biologische Restaktivität der erfindungsgemäßen Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugate, bezogen auf die Ausgangsaktivität des Proteins, beträgt in der Regel mindestens 40%, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95%.

[0021] Die erfindungsgemäß eingesetzte Hydroxyalkylstärke (HAS) kann nach einem bekannten Verfahren, z. B. Hydroxyalkylierung von Stärke an der C<sub>2</sub>- und/oder C<sub>6</sub>-Position der Anhydroglucoseeinheiten mit Alkylenoxid oder 2-Chloralkanol, z. B. 2-Chlorethanol, (siehe z. B. US 5,218,108 für die Hydroxyethylierung von Stärke), mit verschiedenen gewünschten Molekulargewichtsbereichen und Substitutionsgraden hergestellt werden. Es können auch beliebige der im Handel erhältlichen Präparationen eingesetzt werden. Die Definition der Alkylgruppierung in "Hydroxyalkylstärke", wie hier verwendet, schließt Methyl, Ethyl, Isopropyl und n-Propyl ein, wobei Ethyl besonders bevorzugt ist. Ein wesentlicher Vorteil der HES ist es, dass diese als biokompatibler Plasmaexpander bereits behördlich zugelassen ist und in großem Stil klinisch eingesetzt wird.

[0022] Das mittlere Molekulargewicht der Hydroxyalkylstärke kann im Bereich von etwa 3 kD bis mehreren Millionen Dalton, vorzugsweise etwa 4 kD bis etwa 1000 kD, bevorzugter im Bereich von etwa 4 kD bis etwa 50 kD oder im Bereich von etwa 70 kD bis etwa 1000 kD, besonders bevorzugt bei etwa 130 kD, liegen. Für die Kopplung an kleine Proteine wird das mittlere Molekulargewicht der Hydroxyalkylstärke vorzugsweise so gewählt, daß der oben genannte Schwellenwert von 70 kD bei den Konjugaten überschritten wird, während für die Kopplung an große Proteine das Molekulargewicht der Hydroxyalkylstärke vorzugsweise im unteren Bereich des genannten Spektrums liegen wird. Da eine Kopplung an mehreren Stellen eines Proteins möglich ist, kann es auch vorteilhaft sein, mehrere kleine Polymerketten, statt einer hochmolekularen zu koppeln. Der Substitutionsgrad (Verhältnis der Anzahl modifizierter Anhydroglucoseeinheiten zur Anzahl der gesamten Anhydroglucoseeinheiten) kann ebenfalls variieren und wird häufig im Bereich von etwa 0,2 bis 0,8, vorzugsweise etwa 0,3 bis 0,7, noch bevorzugter etwa 0,5, liegen. (Anmerkung: Die Zahlen beziehen sich auf den "Degree of Substitution", der zwischen 0 und 1 liegt). Das Verhältnis von C<sub>2</sub>- zu C<sub>6</sub>-Substitution liegt gewöhnlich im Bereich von 4 bis 16, vorzugsweise im Bereich von 8 bis 12.

[0023] Diese Parameter lassen sich nach bekannten Verfahren einstellen. Erfahrungen mit der Verwendung von Hydroxyethylstärke (HES) als Blutersatzstoff haben gezeigt, dass die Verweilzeit von HES im Plasma vom Molekulargewicht und dem Substitutionsgrad und Substitutionstyp (C<sub>2</sub>-Substitution oder C<sub>6</sub>-Substitution) abhängt, wobei ein höheres Molekulargewicht, ein höherer Substitutionsgrad und ein höherer Anteil der C<sub>2</sub>-Substitution die Verweilzeit erhöht.

[0024] Diese Beziehungen gelten auch für die erfindungs-

gemäßen Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugate, so dass die Verweilzeit eines bestimmten Konjugats im Plasma über den Polysaccharidanteil einstellbar ist.

[0025] Hydroxyethylstärke-Präparate mit einem mittleren Molekulargewicht von 130 kD und einem Substitutionsgrad von 0,5 bzw. mit einem mittleren Molekulargewicht von 200 kD und einem Substitutionsgrad von 0,25 fanden bereits klinische Anwendung als Blutersatzstoffe und sind auch für den Einsatz in der vorliegenden Erfindung geeignet.

[0026] Als Protein ist in der vorliegenden Erfindung grundsätzlich jedes Protein geeignet, das die erforderliche funktionelle Gruppe, z. B. eine freie Aminogruppe, Thiolgruppe oder Carboxylgruppe, zur Reaktion mit der funktionellen Gruppe des HAS-Moleküls besitzt.

[0027] Zur Einführung einer gewünschten funktionellen Gruppe kann das Protein auch mit einem geeigneten, physiologisch verträglichen, bifunktionellen Linkermolekül umgesetzt werden. Die verbleibende reaktionsfähige funktionelle Gruppe des angekoppelten Linkermoleküls wird dann für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ebenfalls als "reaktionsfähige funktionelle Gruppe des Proteins" betrachtet.

[0028] Geeignete Linkermoleküle enthalten an einem Ende eine Gruppierung, die mit einer reaktionsfähigen funktionellen Gruppe des Proteins, z. B. einer Amino-, Thiol- oder Carboxylgruppe, eine kovalente Bindung eingehen kann, und am anderen Ende eine Gruppierung, die mit der endständigen Aldehydgruppe oder einer daraus durch chemische Umsetzung hervorgegangenen funktionellen Gruppe, z. B. einer Carboxylgruppe, aktivierten Carboxylgruppe, Amino- oder Thiolgruppe, eine kovalente Bindung eingehen kann. Zwischen den beiden funktionellen Gruppen des Linkermoleküls befindet sich ein biologisch verträgliches Brückenmolekül geeigneter Länge, z. B. eine Gruppierung, die sich von einem Alkan ableitet, eine (Oligo)alkylenglycolgruppierung oder eine andere geeignete Oligomergruppierung. Bevorzugte Gruppierungen, die mit Aminogruppen reagieren können, sind z. B. N-Hydroxysuccinimidester, Sulfo-N-hydroxysuccinimidester, Imidoester und andere aktivierte Carboxylgruppen; bevorzugte Gruppierungen, die mit Thiolgruppen reagieren können, sind z. B. Maleimid- und Carboxylgruppen; bevorzugte Gruppierungen, die mit Aldehyd- oder Carboxylgruppen reagieren können, sind z. B. Amino- oder Thiolgruppen.

[0029] Beispielhafte Linkermoleküle zur Verknüpfung von SH- und NH-Funktionen sind:

AMAS (N- $\alpha$ -(Maleimidoacetoxy)succinimidester)  
BMPS (N- $\beta$ -(Maleimidopropoxy)succinimidester)  
GMBS (N- $\gamma$ -(Maleimidobutyloxy)succinimidester)  
EMCS (N- $\epsilon$ -(Maleimidocaproyloxy)succinimidester)  
MBS (m-(Maleimidobenzoyl)-N-hydroxysuccinimidester)  
SMCC (Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat)

SMPB (Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat)  
SPDP (Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat)  
Sulfo-GMBS (N- $\gamma$ -(Maleimidobutyloxy)sulfosuccinimidester)

Sulfo-EMCS (N- $\epsilon$ -(Maleimidocaproyloxy)sulfosuccinimidester).

[0030] Beispielhafte Linkermoleküle zur Verknüpfung von SH- und SH-Funktionen sind:

BMB (1,4-Bis-maleimidobutan)  
BMDB (1,4-Bis-maleimido-2,3-dihydroxybutan)  
BMH (Bis-maleimidohexan)  
BMOE (Bis-maleimidoethan)  
DTMB (Dithio-bis-maleimidooethan)  
HBVS (1,6-Hexan-bis-vinylsulfon)

BM(PEO)<sub>3</sub> (1,8-Bis-maleimidotriethylenglycol)  
 BM(PEO)<sub>4</sub> (1,11-Bis-maleimidotetraethylenglycol).  
 [0031] Beispielhafte Linkermoleküle zu Verknüpfung von NH- und NH-Funktionen sind:  
 BSOCOES (Bis-(2-(succinimidylloxycarbonyl)ethyl)sulfon)  
 BS<sup>3</sup> (Bis-(sulfosuccinimidyl)suberat)  
 DFDNB (1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol)  
 DMA (Dimethyladipimidat HCl))  
 DSG (Disuccinimidylglutarat)  
 DSS (Disuccinimidylsuberat)  
 EGS (Ethylenglycol-bis-(succinimidylsuccinat)).  
 [0032] Beispielhafte Linkermoleküle zur Verknüpfung von SH- und CHO-Funktionen sind:  
 BMPH (N-(β-Maleimidopropionsäure)hydrazid TFA)  
 EMCA (N-(ε-Maleimidocapronsäure)hydrazid)  
 KMUH (N-(κ-Maleimidoundecansäure)hydrazid)  
 M<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H (4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylhydrazid HCl)  
 MPBH (4-(4-N-Maleimidophenyl)buttersäurehydrazid HCl)  
 PDPH (3-(2-Pyridyldithio)propionylhydrazid).  
 [0033] Ein beispielhaftes Linkermolekül zur Verknüpfung von SH- und OH-Funktionen ist PMPI (N-(p-Maleimidophenyl)isocyanat).  
 [0034] Beispielhafte Linkermoleküle zur Überführung einer SH-Funktion in eine COOH-Funktion sind:  
 BMPA (N-β-Maleimidopropionsäure)  
 EMCH (N-β-Maleimidocapronsäure)  
 KMUA (N-κ-Maleimidoundecansäure).  
 [0035] Beispielhafte Linkermoleküle zur Überführung einer NH-Funktion in eine COOH-Funktion sind MSA (Methyl-N-succinimidyladipat) oder länger-kettige Homologe davon oder entsprechende Derivate von Ethylenglycol.  
 [0036] Beispielhafte Linkermoleküle zur Überführung einer COOH-Funktion in eine NH-Funktion sind DAB (1,4-Diaminobutan) oder länger-kettige Homologe davon oder entsprechende Derivate von Ethylenglycol.  
 [0037] Ein beispielhaftes Linkermolekül, das mit einer Aminogruppe eines Moleküls reagiert und eine geschützte Aminogruppe in größerem Abstand von diesem Molekül zur Vermeidung einer sterischen Hinderung bereitstellt, ist TFCS (N-ε-(Trifluoracetylcaproyloxy)succinimidester).  
 [0038] Weitere geeignete Linkermoleküle sind Fachleuten bekannt und im Handel erhältlich oder können je nach Bedarf und in Abhängigkeit von den vorhandenen und gewünschten funktionellen Gruppen der HAS und des anzukoppelnden Proteins entworfen und nach bekannten Verfahren hergestellt werden.  
 [0039] Der Begriff "Protein" im Sinne der vorliegenden Erfindung soll jede Aminosäuresequenz einschließen, die mindestens 9-12 Aminosäuren, vorzugsweise mindestens 15 Aminosäuren, bevorzugter mindestens 25 Aminosäuren, besonders bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren, umfaßt, und auch natürliche Derivate, z. B. Prä- oder Pro-Formen, Glycoproteine, Phosphoproteine, oder synthetische modifizierte Derivate, z. B. Fusionsproteine, Neoglycoproteine, oder durch gentechnologische Verfahren modifizierte Proteine, z. B. Fusionsproteine, Proteine mit Aminosäureaustauschen zur Einführung bevorzugter Kopplungsstellen, einschließen.  
 [0040] Zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers wird das betreffende Protein eine bestimmte gewünschte Funktion im Körper ausüben. Vorzugsweise besitzt das Protein daher z. B. eine regulatorische oder katalytische Funktion, eine Signalvermittlungs- oder Transportfunktion oder eine Funktion bei der Immunreaktion oder Auslösung einer Im-

munreaktion.

[0041] Das Protein kann beispielsweise aus der Gruppe aus Enzymen, Antikörpern, Antigenen, Transportproteinen, Bioadhäsionsproteinen, Hormonen, Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Rezeptoren, Suppressoren, Aktivatoren, Inhibitoren oder einem funktionellen Derivat oder Fragment davon ausgewählt sein. "Funktionelles Derivat oder Fragment" bedeutet in diesem Zusammenhang ein Derivat oder Fragment, das eine gewünschte biologische Eigenschaft oder Aktivität des Stammoleküls ganz oder teilweise, z. B. zu mindestens 10-30%, bevorzugter zu mehr als 50%, noch bevorzugter zu mehr als 70%, am meistens bevorzugter zu mehr als 90%, behalten hat. Besonders bevorzugte Beispiele eines solchen Fragments sind Antikörperfragmente.  
 [0042] Spezielle Beispiele sind α-, β- oder γ-Interferon, Interleukine, z. B. IL-1 bis IL-18, Wachstumsfaktoren, z. B. epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Thrombozytenwachstumsfaktor (PDGF), Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), Gehirn-abgeleiteter Wachstumsfaktor (BDGF), Nervenwachstumsfaktor (NGF), B-Zellen-Wachstumsfaktor (BCGF), Gehirn-abgeleiteter neurotropher Wachstumsfaktor (BDNF), Ciliärer neurotropher Faktor (CNTF), transformierende Wachstumsfaktoren, z. B. TGF-α oder TGF-β, Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF), z. B. GM-CSF, G-CSF, BMP ("bone morphogenic proteins"), Wachstums-hormone, z. B. Human-Wachstumshormon, Tumornekrosefaktoren, z. B. TNF-α oder TNF-β, Somatostatin, Somatotropin, Somatomedine, Serumproteine, z. B. die Gerinnungsfaktoren II-XIII, Albumin, Erythropoietin, Myoglobin, Hämoglobin, Plasminogenaktivatoren, z. B. Gewebe-Plasminogenaktivator, Hormone oder Prohormone, z. B. Insulin, Gonadotropin, Melanocyten-stimulierendes Hormon (α-MSH), Triptorelin, Hypothalamushormone z. B. antidiuretische Hormone (ADH) und Oxytocin sowie Liberine und Statine, Parathormon, Schilddrüsenhormone, z. B. Thyroxin, Thyrotropin, Thyroliberin, Prolactin, Calcitonin, Glucagon, Glucagon-ähnliche Peptide (GLP-1, GLP-2 etc.), Exendine, z. B. Exendin-4, Leptin, Vasopressin, Gastrin, Secretin, Integrine, Glycoprotein-hormone (z. B. LH, FSH etc.), Pigmenthormone, Lipoproteine und Apo-Lipoproteine, z. B. Apo-B, Apo-E, Apo-L<sub>a</sub>, Immunglobuline, z. B. IgG, IgE, IgM, IgA, IgD oder ein Fragment davon, Hirudin, "Tissue-Pathway"-Inhibitor, Pflanzenproteine, z. B. Lektin oder Ricin, Bienengift, Schlangengifte, Immuntoxine, Antigen E, Butiroxobina, Alpha-Proteinase-Inhibitor, Ragweed-Allergen, Melanin, Oligolysin-Proteine, RGD-Proteine oder gegebenenfalls entsprechende Rezeptoren für eines dieser Proteine; oder ein funktionelles Derivat oder Fragment eines dieser Proteine oder Rezeptoren.  
 [0043] Geeignete Enzyme können z. B. aus den Gruppen der kohlenhydratspezifischen Enzyme, proteolytischen Enzyme, Oxidasen, Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen, Kinasen und Ligasen ausgewählt sein. Spezielle, nicht beschränkende Beispiele sind Asparaginase, Arginase, Arginindeaminase, Adenosindeaminase, Glutaminase, Glutaminase-Asparaginase, Phenylalaninammoniumlyase, Tryptophanase, Tyrosinase, Superoxiddismutase, eine Endotoxinase, eine Catalase, Peroxidase, Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Thermolysin, eine Lipase, eine Uricase, Adenosindiphosphatase, Purinnukleosiddiphosphorylase, Bilirubinoxidase, eine Glucoseoxidase, Glucodase, Gluconatoxidase, Galaktosidase, Glucocerebroxidase, Glucuronidase, Hyaluronidase, Gewebefaktor, ein Gewebeplasminogenaktivator, Streptokinase, Urokinase, MAP-Kinasen, DNAsen, RNAsen, Lactoferrin, und funktionelle Derivate oder Fragmente davon.  
 [0044] Wie oben erwähnt, ist die an der Kopplungsreaktion beteiligte funktionelle Gruppe des HAS-Moleküls die

endständige Aldehydgruppe oder eine daraus durch chemische Umsetzung hervorgegangene Gruppe.

[0045] Ein Beispiel für eine solche chemische Umsetzung ist die selektive Oxidation dieser Aldehydgruppe mit einem schonenden Oxidationsmittel, wie z. B. Iod, Brom oder einigen Metallionen, oder auch mittels elektrochemischer Oxidation zu einer Carboxylgruppe oder aktivierten Carboxylgruppe, z. B. einem Ester, Lacton, Amid, wobei die Carboxylgruppe gegebenenfalls in einer zweiten Reaktion in das aktivierte Derivat überführt wird. Diese Carboxylgruppe oder aktivierte Carboxylgruppe kann dann mit einer primären Amino- oder Thiolgruppe des Proteins unter Ausbildung einer Amidbindung oder Thioesterbindung gekoppelt werden.

[0046] In einem besonders bevorzugten Herstellungsverfahren wird diese Aldehydgruppe mit einem molaren Überschuß an Iod, vorzugsweise in einem Molverhältnis von Iod zu HAS von 2 : 1 bis 20 : 1, besonders bevorzugt etwa 5 : 1 bis 6 : 1, in wäßriger basischer Lösung selektiv oxidiert. Nach dem in Beispiel 1 beschriebenen optimierten Verfahren wird zunächst eine Menge an Hydroxyalkylstärke in warmem destilliertem Wasser gelöst und etwas weniger als 1 Moläquivalent wäßriger Iodlösung, vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0,05–0,5 N, besonders bevorzugt etwa 0,1 N, zugegeben. Danach wird eine wäßrige NaOH-Lösung in einer molaren Konzentration, die etwa das 5–15fache, vorzugsweise etwa das 10fache, der Iodlösung beträgt, langsam tropfenweise in Abständen von mehreren Minuten der Reaktionslösung zugegeben, bis die Lösung nach der Zugabe beginnt, wieder klar zu werden. Es wird erneut etwas weniger als 1 Moläquivalent der obigen wäßrigen Iodlösung der Reaktionslösung zugegeben, das Zutropfen der NaOH-Lösung wieder aufgenommen und die Zugabe von Iod und NaOH werden solange wiederholt, bis etwa 5,5–6 Moläquivalente Iodlösung und 11–12 Moläquivalente NaOH-Lösung, bezogen auf die Hydroxyalkylstärke, zugegeben worden sind. Dann wird die Reaktion abgebrochen, die Reaktionslösung entsalzt, z. B. durch Dialyse oder Ultrafiltration, einer Kationenaustauschchromatographie unterworfen und das Reaktionsprodukt durch Lyophilisierung gewonnen. Bei diesem Verfahren werden unabhängig vom Molekulargewicht der HAS fast quantitative Ausbeuten erzielt.

[0047] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die selektive Oxidation mit alkalischen stabilisierten Lösungen von Metallionen, z. B.  $\text{Cu}^{++}$  oder  $\text{Ag}^+$ , ebenfalls in etwa quantitativer Ausbeute (Beispiel 2). Vorzugsweise wird dabei ein etwa 3–10facher molarer Überschuß des Oxidationsmittels eingesetzt.

[0048] Anschließend wird die gebildete selektiv oxidierte Hydroxyalkylstärke (ox-HAS) in Gegenwart eines Aktivierungsreagenzes mit einer freien Aminogruppe des gewünschten Proteins unter Ausbildung einer Amidbindung umgesetzt. Geeignete Aktivierungsreagenzien sind z. B. N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxyphthalimid, Thiophenol, p-Nitrophenol, o,p-Dinitrophenol, Trichlorphenol, Trifluorphenol, Pentachlorphenol, Pentafluorphenol, 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HOBt), HOObt, HNSA, 2-Hydroxypyridin, 3-Hydroxypyridin, 3,4-Dihydro-4-oxobenzotriazin-3-ol, 4-Hydroxy-2,5-diphenyl-3(2H)-thiophenon-1,1-dioxid, 3-Phenyl-1-(p-nitrophenyl)-2-pyrazolin-5-on, [1-Benzotriazolyl-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat] (BOP), [1-Benzotriazolyl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP), [O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU), [O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluorborat (TBTU), [O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-bis(pentamethylen)uroniumhexafluorophosphat,

[O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-bis(tetramethylen)uroniumhexafluorophosphat, Carbonyldiimidazol (CDI), oder vorzugsweise Carbodiimide, z. B. 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid (EDC), Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Diisopropylcarbodiimid (DIPC), besonders bevorzugt EDC. Im Gegensatz zu gängigen, in der Literatur beschriebenen Verfahren für ähnliche Kopplungsreaktionen wurde dabei überraschenderweise festgestellt, dass bei Verwendung eines Carbodiimids in der Regel der Einsatz ansonsten obligatorischer weiterer Aktivoren wie Triazole, z. B. HOBt, nicht erforderlich ist bzw. sogar die Ausbeuten verschlechtert. Bei der erfindungsgemäßen Kopplung von ox-HES an verschiedene Modellverbindungen in Gegenwart von EDC und Abwesenheit von HOBt konnten dagegen weitgehend unabhängig vom Molekulargewicht der HES hohe Ausbeuten erzielt werden (siehe Beispiele).

[0049] Statt der Reaktion der Carboxylgruppe oder aktivierten Carboxylgruppe mit einer freien primären Aminogruppe des Proteins (z. B. eines Lysin- oder Argininrests) ist grundsätzlich auch eine analoge Reaktion mit einer Thiolgruppe (eines Cysteins) des Proteins möglich. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass Cysteine in der Regel in S-S-Brücken involviert sind und daher für eine Kopplungsreaktion nicht zur Verfügung stehen. Sind dagegen freie Cysteine vorhanden, so spielen diese häufig eine wichtige Rolle bei der Katalyse oder sind in der Kontaktstelle von Untereinheiten involviert. Eine Modifizierung dieser Cysteine wird dann in einem teilweisen oder vollständigen Verlust der biologischen Aktivität resultieren. Zur Behebung dieses Problems könnten freie Cysteine durch gängige gentechnologische Verfahren wie z. B. gerichtete Mutagenese oder chemische Peptidsynthese an solchen Stellen im Protein eingeführt werden, von denen bekannt ist, dass sie keine Rolle für die Aktivität spielen. Auf diese Weise ist eine optimale Steuerung des Kopplungsortes möglich. Auf dieselbe Weise könnten auch andere reaktionsfähige Aminosäuren, z. B. Lys, His, Arg, Asp, Glu, gezielt in das Protein eingeführt werden.

[0050] Die reaktive Gruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls kann auch eine durch chemische Umsetzung der endständigen Aldehydgruppe entstandene Amino- oder Thiolgruppe sein. Beispielsweise kann eine reduktive Aminierung der Aldehydgruppe durch Reaktion mit Ammoniak in Gegenwart von Wasserstoff und einem Katalysator oder in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid durchgeführt werden. Die entstandene Amino- oder Thiolgruppe kann dann mit einer freien Carboxylgruppe des Proteins (z. B. einer gegebenenfalls aktivierten Glutamin- oder Asparaginsäure) unter Ausbildung einer Amid- oder Thioesterbindung reagieren.

[0051] Ferner kann die endständige Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls oder eine daraus durch chemische Umsetzung hervorgegangene funktionelle Gruppe auch mit einem geeigneten physiologisch verträglichen, bifunktionellen Linkermolekül umgesetzt werden. In diesem Falle ist für die Kopplungsreaktion die "aus der endständigen Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls durch chemische Umsetzung hervorgegangene funktionelle Gruppe" die verbleibende reaktionsfähige funktionelle Gruppe des bifunktionellen Linkermoleküls, mit dem die endständige Aldehydgruppe oder die daraus hervorgegangene funktionelle Gruppe umgesetzt wurde. Auf diese Weise kann die endständige Aldehydgruppe ebenfalls in eine gewünschte funktionelle Gruppe überführt werden.

[0052] Geeignete Linkermoleküle enthalten an einem Ende eine Gruppierung, die mit der endständigen Aldehydgruppe oder einer daraus durch chemische Umsetzung hervorgegangenen funktionellen Gruppe, z. B. einer Carboxyl-

gruppe, aktivierten Carboxylgruppe, Amino- oder Thiolgruppe, eine kovalente Bindung eingehen kann, und am anderen Ende eine Gruppierung, die mit einer reaktionsfähigen funktionellen Gruppe des Proteins, z. B. einer Amino-, Thiol- oder Carboxylgruppe, eine kovalente Bindung eingehen kann. Zwischen den beiden funktionellen Gruppen des Linkermoleküls befindet sich ein biologisch verträgliches Brückenmolekül geeigneter Länge, z. B. eine Gruppierung, die sich von einem Alkan ableitet, eine (Oligo)alkylenglycolgruppierung oder eine andere geeignete Oligomergruppierung. Bevorzugte Gruppierungen, die mit Aminogruppen reagieren können, sind z. B. N-Hydroxysuccinimidester, Sulfo-N-hydroxysuccinimidester, Imidoester oder andere aktivierte Carboxylgruppen; bevorzugte Gruppierungen, die mit Thiolgruppen reagieren können, sind z. B. Maleimid- und Carboxylgruppen; bevorzugte Gruppierungen, die mit Aldehyd- oder Carboxylgruppen reagieren können, sind z. B. Amino- oder Thiolgruppen.

[0053] Eine Reihe von speziellen, nicht beschränkenden Beispielen für geeignete Linkermoleküle wurden bereits oben unter Bezug auf die Konjugation von Linkermolekülen an das Protein angegeben.

[0054] Bei einem alternativen erfindungsgemäßen Kopplungsverfahren der vorliegenden Erfindung wird die endständige Aldehydgruppe direkt mit einer primären Amino- (z. B. eines Lysin- oder Argininrests oder des N-Terminus) des Proteins unter Bildung einer Schiff'schen Base umgesetzt. Anschließend oder parallel dazu wird die gebildete Schiff'sche Base durch Umsetzung mit einem geeigneten Reduktionsmittel reduziert, wodurch eine im wässrigen Milieu stabile Bindung zwischen Protein und HAS entsteht. Bevorzugte Reduktionsmittel sind Natriumborhydrid, Natriumcyanoborhydrid, organische Borkomplexe, z. B. ein 4-(Dimethylamino)pyridin-Borkomplex, N-Ethylisopropylamin-Borkomplex, N-Ethylmorpholin-Borkomplex, N-Methylmorpholin-Borkomplex, N-Phenylmorpholin-Borkomplex, Lutidin-Borkomplex, Triethylamin-Borkomplex, Trimethylamin-Borkomplex; geeignete stereoselektive Reduktionsmittel sind beispielsweise Natriumtriacetatborhydrid, Natriumtriethylborhydrid, Natriumtrimethoxyborhydrid, Kalium-tri-sec-butylborhydrid (K-Selectride), Natrium-tri-sec-butylborhydrid (N-Selectride), Lithium-tri-sec-butylborhydrid (L-Selectride), Kaliumtriämylborhydrid (KS-Selectride) und Lithiumtriämylborhydrid (LS-Selectride).

[0055] Durch geeignete Variation der Reaktionsbedingungen können die Ausbeuten verbessert werden. Parameter für solche Optimierungsversuche sind der pH-Wert des Reaktionsansatzes (möglicher Proteinabbau durch alkalisches Borhydrid), Temperatur und Dauer des Inkubation sowie Art des Reduktionsmittels für die Eintopfreaktion. Eine weitere Alternative stellt die Möglichkeit dar, die Reaktion in zwei Schritten durchzuführen, wobei für den Reduktionsschritt ein immobilisiertes Reduktionsmittel eingesetzt werden kann.

[0056] Die Reaktionsprodukte der Kopplung können mit bekannten Verfahren untersucht und die Kopplungseffizienz festgestellt werden. So können z. B. die freien primären Aminogruppen im Protein vor und nach der Kopplung mit Trinitrobenzolsulfonsäure (Habeeb, ASAF, Anal. Biochem. 14, 328-336 (1966)) bestimmt werden. Die Kopplungsausbeute von Reaktionen unter Beteiligung primärer Amine könnte auch durch Derivatisierung der nicht umgesetzten Amine mit Fluorescamin und Bestimmung der Fluoreszenz festgestellt werden. Die Molekulargewichtsverteilung kann durch SDS-PAGE und Gelpermeation festgestellt werden. Der Proteinanteil im Konjugat ist durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung nachzuweisen, während der Sac-

charidanteil durch eine Glykan-spezifische Färbung der mittels SDS-PAGE getrennten Banden nach Blotting auf eine Membran feststellbar ist. Auch eine quantitative Glykanbestimmung ist möglich. Eine genaue Identifizierung der Kopplungsstelle auf dem Protein ist durch Peptid-Mapping und/oder MALDI-TOF-Massenspektroskopie bzw. Elektrosprayionisation-Massenspektroskopie möglich. Auf diese Weise kann die Kopplung optimiert und die Molekulargewichtsverteilung sowie möglicherweise (z. B. bei unterschiedlicher Reaktivität der reaktionsfähigen Gruppen auf dem Protein) sogar die Kopplungsstelle der Produkte vorbestimmt werden.

[0057] Die Konjugate der vorliegenden Erfindung können gegebenenfalls als solche oder in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers eingesetzt werden.

[0058] Derartige Zusammensetzungen umfassen eine pharmazeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen Konjugats als aktiven Bestandteil sowie einen pharmazeutisch geeigneten Träger und gegebenenfalls andere therapeutische bzw. galenische Bestandteile oder Hilfsstoffe. Hilfsstoffe können z. B. Verdünnungsmittel, Puffer, Geschmacksmittel, Bindemittel, oberflächenaktive Mittel, Verdickungsmittel, Gleitmittel, Konservierungsmittel (einschließlich Antioxidantien) sowie Substanzen einschließen, die dazu dienen, die Formulierung mit dem Blut des vorgesehenen Empfängers isotonisch zu machen. Eine pharmazeutisch wirksame Menge ist diejenige Menge, welche ausreicht, um bei einmaliger oder mehrmaliger Verabreichung im Rahmen einer Behandlung zur Erleichterung, Heilung oder Verhütung eines Krankheitszustands eine gewünschte positive Wirkung zu entfalten. Ein pharmazeutisch annehmbarer Träger ist ein Träger, der sowohl mit dem Arzneimittelwirkstoff als auch mit dem Körper des Patienten kompatibel ist.

[0059] Die Form der Zusammensetzung wird je nach dem gewünschten bzw. geeigneten Verabreichungsweg variieren. Ein bevorzugter Weg ist die parenterale Verabreichung, z. B. eine subkutane, intramuskuläre, intravenöse, intraarterielle, intraartikuläre, intrathekale, extradurale Injektion bzw. gegebenenfalls Infusion. Ebenfalls möglich ist eine intranasale, intratracheale oder topische Applikation. Eine topische Applikation von erfindungsgemäß konjugierten Wachstumsfaktoren könnte beispielsweise die Wundheilung beschleunigen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können günstigerweise in Form einer Dosierungseinheit dargeboten werden und nach irgendeinem der auf dem Gebiet der Pharmazie wohlbekannten Verfahren hergestellt werden.

[0060] Die Konjugate der vorliegenden Erfindung können auch auf allen anderen Gebieten eingesetzt werden, bei denen andere Protein-Polymer-Konjugate, z. B. PBG-Protein-Konjugate, zur Anwendung kamen. Einige spezielle, nicht beschränkende Beispiele sind die Verwendung eines HAS-Protein-Konjugats als immobilisierter Katalysator oder Reaktionspartner für eine Reaktion in heterogener Phase oder als Säulenmaterial für die (Immun)affinitätschromatographie. Weitere Anwendungsmöglichkeiten werden für den Fachmann in Kenntnis der hier offenbarten Eigenschaften der erfindungsgemäßen HAS-Protein-Konjugate unschwer ersichtlich sein.

[0061] Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne diese jedoch darauf zu beschränken. Insbesondere können analoge Reaktionen auch mit Hydroxymethylstärke und Hydroxypropylstärke durchgeführt und ähnliche Ergebnisse erzielt werden.

## BEISPIEL 1

## Selektive Oxidation von Hydroxyethylstärke (HES) mit Iod

[0062] In einem Rundkolben wurden 10 g HES-130 kD in 12 ml entionisiertem Wasser unter Erwärmen gelöst. Zu dieser Lösung wurden 2 ml einer 12-Lösung (0.1 N) gegeben. Eine Pipette mit 2 ml 1.0 N NaOH wurde mit dem Kolben über ein 2-Wege-Verbindungsstück verbunden und die NaOH-Lösung mit ca. 1 Tropfen pro 4 Minuten zugegeben. Nach Zugabe von ungefähr 0.2 ml der NaOH-Lösung war die Lösung entfärbt, zu diesem Zeitpunkt wurde eine zweite Portion von 2 ml 0.1 N Iodlösung zugegeben. Die Reaktion war nach Zugabe von insgesamt 14 ml Iodlösung und 2.8 ml NaOH-Lösung beendet. Die Reaktionsmischung wurde anschließend gegen entionisiertes Wasser dialysiert.

## Lactonisierung

[0063] Die teilweise entsalzte Lösung wurde einer Chromatographie an einer Kationenaustauschersäule (Amberlite IR-120, H<sup>+</sup>-Form) unterzogen, um die Aldonatgruppen in Aldonsäuregruppen umzuwandeln. Anschließend wurde das Wasser durch Lyophilisation entfernt und so die Lactonform erhalten. Bestimmung des Oxidationsgrades:

[0064] Zu jeweils 1 ml Probenlösung werden unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre 1 ml alkalisches Kupferreagenz (3.5 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.0 g K-Na-Tartrat in 50 ml H<sub>2</sub>O, dazu 10 ml 1 N NaOH, 8.0 ml 10%iger (Gew./Vol.) CuSO<sub>4</sub>-Lösung und 0.089 g K-Iodat in 10 ml H<sub>2</sub>O, nach Zugabe von 18 g Na-Sulfat auf 100 ml auffüllen) pipettiert. Es wird 45 Minuten bei 100°C erhitzt. Nach Abkühlen werden 0.2 ml 2.5%iger KI-Lösung und 0.15 ml 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> addiert. Nach 5 Min. wird mit 1 Tropfen Phenolrot-Indikatorlösung (1% Gew./Vol.) versetzt und mit 5 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung bis zum Verschwinden der Farbe titriert. Aus dem Verbrauch an Titrationsmittel läßt sich die Konzentration nichtumgesetzter Aldehydgruppen berechnen.

[0065] Es wurde eine annähernd quantitative Ausbeute erzielt (> 98%). Hydroxyethylstärken mit höherer molarer Masse (z. B. 130 kD, 250 kD, 400 kD) konnten, genauso wie Hydroxyethylstärken mit niedrigerer molarer Masse (z. B. 10 kD, 25 kD, 40 kD), nach dieser Vorschrift in ähnlich hohen Ausbeuten oxidiert werden.

## BEISPIEL 2

Selektive Oxidation von HES mit Cu<sup>2+</sup>-Ionen

[0066] Unter Erwärmen wurde eine Lösung von 0.24 mMol HES-130 kD in 10 ml entionisiertem Wasser hergestellt. Diese Lösung wurde in einem 100-ml-Rundkolben auf eine Temperatur von 70–80°C erhitzt und mit 1.17 mMol stabilisiertem Cu<sup>2+</sup> (z. B. Rochelle-Salz als Stabilisator oder andere Stabilisatoren) und wässriger verd. NaOH-Lösung versetzt (Endkonzentration 0.1 N NaOH). Danach wurde die Temperatur auf 100°C erhöht und die Reaktion solange laufen lassen, bis eine rötliche Farbe entstanden war. Die Reaktion wurde gestoppt und die Reaktionsmischung auf 4°C abgekühlt. Der rötliche Niederschlag wurde durch Filtration entfernt. Das Filtrat wurde gegen entionisiertes Wasser dialysiert und anschließend wie in Beispiel 1 in das Lacton umgewandelt und lyophilisiert. Die Oxidation verlief quantitativ (Ausbeute > 99%). Nach dieser Methode ließen sich auch niedermolekulare HES (z. B. HES-10 kD, HES-25 kD, HES-40 kD) und höhermolekulare HES-Spezies oxidieren.

## BEISPIEL 3

## Kopplung von selektiv oxidiertem hochmolekularem HES (ox-HES-130 kD) an Humanserumalbumin (HSA)

[0067] in einem Rundkolben mit Magnetrührer wurden 4.3 g ox-HES-130 kD und 200 mg HSA (Sigma, Taufkirchen) unter leichtem Erwärmen vollständig in Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurden 30 mg Ethyldimethylamino-propylcarbodiimid (EDC), gelöst in Wasser, zugegeben. Nach 2 h unter sehrmäßigem Rühren wurde eine zweite Portion von 30 mg EDC zugegeben. Nach weiteren zwei Stunden unter sehrmäßigem Rühren wurde eine dritte Portion von 40 mg des Carbodiimids zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter diesen Bedingungen über Nacht belassen, 15 h lang gegen destilliertes Wasser dialysiert und lyophilisiert. Der Erfolg der Kopplung wurde mittels Gel-permeationschromatographie, SDS-PAGE und kohlenhydratspezifischer Färbung (Glyco-Dig-Kit von Roche-Boehringer, Basel) nach Blotting auf eine PVDF-Membran nachgewiesen. Die Ausbeute an Kopplungsprodukt betrug ca. 90%.

## BEISPIEL 4

## Kopplung von selektiv oxidiertem niedermolekularem HES (ox-HES-10 kD) an Humanserumalbumin (HSA)

[0068] In einem Rundkolben mit Magnetrührer wurden 7.4 g ox-HES-10 kD und 50 mg HSA vollständig in Wasser gelöst. Die Reaktion wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren für hochmolekulare HES durchgeführt, wobei insgesamt 282 mg EDC in drei Aliquots zugegeben wurden. Die Reaktionsmischung wurde ebenfalls dialysiert und lyophilisiert wie oben beschrieben. Die Analyse (wie oben) zeigte, dass Kopplungsprodukt erhalten wurde, jedoch waren die Ausbeuten etwas niedriger als bei der Kopplung mit hochmolekularem ox-HES.

## BEISPIEL 5

## Kopplung von ox-HES-130 kD an Myoglobin (Mb)

[0069] 4.3 g ox-HES-130 kD wurden vollständig in Wasser (6–7 ml) gelöst und anschließend 100 mg Mb (Sigma, Taufkirchen), gelöst in 10 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0), zugegeben. Die Kopplungsreaktion wurde durch Zugabe von 30 mg EDC gestartet. Die Zugabe von EDC wurde alle 2 Stunden wiederholt, bis insgesamt 90 mg des Carbodiimids verbraucht waren. Die Reaktionsmischung wurde anschließend gegen 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.0, dialysiert und lyophilisiert. Die GPC zeigte einen eindeutigen Produktpeak, der im Ausschlussvolumen bei 450 nm detektiert wurde. Aus diesem konnte eine Kopplungsausbeute von 88% berechnet werden. Die Sauerstoffbindungskapazität des hesylierten Myoglobins betrug ca. 76% der Bindungskapazität des unmodifizierten Mb.

## BEISPIEL 6

## Kopplung von ox-HES-10 kD an Superoxiddismutase (SOD)

[0070] Ein Volumenteil einer wässrigen Lösung von ox-HES-10 kD (1.05 g/ml) wurde mit einem Volumenteil einer 7 mg/ml SOD-Lösung (Sigma, Taufkirchen) in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.6, bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kopplungsreaktion wurde durch Zugabe von 280 mg EDC

in 5 Portionen über einen Zeitraum von 24 h initiiert. Der Reaktionsverlauf wurde durch GPC-Analytik in Phosphatpuffer und Detektion bei 280 nm verfolgt. Nach 24 h wurden 81% des Proteins im hochmolekularen Bereich der Trennsäule gefunden und die Reaktion nach dieser Zeit abgebrochen. Die Reaktionsmischung wurde einer Diafiltration mit einer 30-kD-Membran unterzogen und anschließend lyophilisiert. Massenspektrometrische Analyse des Produktes zeigte im Mittel ein molares Verhältnis von HES zu Protein von ca. 3 : 1.

## BEISPIEL 7

## Kopplung von ox-HES-130 kD an Streptokinase (SK)

[0071] 3.8 g ox-HES-130 kD wurden zusammen mit 35 mg Streptokinase (Sigma, Taufkirchen) in möglichst wenig 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.2, gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 46.5 mg EDC und 20 mg 1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (HOBt) zugegeben und Reaktion für insgesamt 24 h unter leichtem Rühren gehalten. Nach Dialyse und Gefriertrocknung wurden nach GPC-Analyse ca. 78% des Proteins als HES-Konjugat gefunden. In der SDS-PAGE war mit Silberfärbung eine deutliche Erhöhung der molaren Masse der Streptokinase zu beobachten. Parallel dazu konnten in der hochmolekularen Bande Kohlenhydrat-Strukturen mit der Digoxigenin-Methode eindeutig nachgewiesen werden.

## BEISPIEL 8

## Kopplung von ox-HES-130 kD an humanes Interleukin-2 (IL-2)

[0072] 45 mg ox-HES-130 kD wurden in 0.5 ml 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 6.5, unter leichtem Erwärmen vollständig gelöst. Nach Zugabe von 0.25 mg humanem IL-2 (Sigma, Taufkirchen), wodurch die Lösung opak wurde, wurde bei Raumtemperatur 4–6 h gerührt. Anschließend wurden 5 mg EDC in 4 Portionen mit jeweils 2 h Zeitdifferenz zugegeben und über Nacht weitergerührt, wobei eine klare Lösung entstand. Analyse mit GPC ergab ca. 65% Kopplungsausbeute.

## BEISPIEL 9

Kopplung von ox-HES-25 kD an humanen Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )

[0073] Zu 86 mg ox-HES-25 kD in ca. 0.4 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0) wurden 0.3 mg hTNF $\alpha$  (Sigma, Taufkirchen) gegeben. Die trübe Lösung wurde für ca. 2 h gerührt bevor 1 mg EDC und 0.5 mg HOBt zugegeben wurden. Es wurde für ca. 6 h weitergerührt, wobei die Lösung im Laufe der Reaktionszeit klar wurde. Das Kopplungsprodukt wurde durch Ultrafiltration und Gefriertrocknung isoliert und mittels GPC und Detektion bei 280 nm analysiert. Dabei wurde eine Kopplungsausbeute von annähernd 74% gefunden.

## BEISPIEL 10

## Kopplung von ox-HES-130 kD an "Glucagon-like Peptide" (GLP-1)

[0074] In einem möglichst geringen Volumen Wasser wurden 7.4 g ox-HES-130 kD unter Erwärmen und leichtem Rühren gelöst. Dazu wurde eine Lösung von 10 mg GLP-1 in der Amid-Form (Bachem, Schweiz) in 50 mM Phosphat-

puffer, pH 7.4, pipettiert.

[0075] Die Reaktion wurde durch Zugabe von 35 mg EDC gestartet und für 2 h vorsichtig gerührt. Dies wurde noch 2 x wiederholt, da nach dieser Zeit in der GPC-Analyse bei 280 nm kein Peptid-Peak mehr zu erkennen war, d. h., eine annähernd vollständige Umsetzung zum Kopplungsprodukt stattgefunden hatte. Dieses Kopplungsprodukt wurde mit einer 30 kD-Membran diafiltriert und aus Phosphatpuffer-Lösung lyophilisiert. Aus den Ergebnissen einer MALDI-Massenspektroskopie konnte auf eine 1 : 1-Stöchiometrie zwischen Peptid und HES geschlossen werden.

## Beispiel 11

## 15 Kopplung von hochmolekularer HES (HES-130 kD) an Humanserumalbumin (HSA)

[0076] 9.75 g HES-130 kD wurden vollständig in Wasser (6–7 ml) gelöst und anschließend 50 mg HSA, gelöst in 1 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4), zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde mit einem Magnetrührer gerührt. Die Lösung wurde dann mit NaBH<sub>3</sub>CN (50–70 mg) gemischt und einige Minuten leicht gerührt. Die Lösung wurde weiter alle zwei Stunden für 15 Minuten gerührt. Danach wurde ein weiteres Aliquot von NaBH<sub>3</sub>CN (etwa 50 mg) zugegeben. Am Ende (nach fast 36 h Reaktionszeit) war eine Gesamtmenge von 285 mg NaBH<sub>3</sub>CN eingesetzt worden. Die Lösung wurde dann dialysiert und lyophilisiert. Die Analyse erfolgte wie in Beispiel 4 beschrieben. Die Kopplungseffizienz betrug etwa 65%.

## Beispiel 12

## Kopplung von niedermolekularer HES (HES-10 kD) an Humanserumalbumin (HSA)

[0077] 4.5 g HES wurden vollständig in Wasser (4–5 ml) gelöst und dann 50 mg HSA, gelöst in 1 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4), zugegeben. Als die Lösung klar war, erforderlichenfalls durch Rühren mit einem Magnetrührer bewirkt, wurde NaBH<sub>4</sub> (50–70 mg) zugegeben und unter leichtem Rühren eingemischt. Die Lösung wurde ohne Rühren zwei Stunden lang stehengelassen und dann alle zwei Stunden für 15 Minuten gerührt, wie bei der Reaktion mit hochmolekularer HES. Als die Lösung keine Blasen (H<sub>2</sub>-Entwicklung) mehr zeigte, wurde ein weiteres Aliquot von NaBH<sub>4</sub> (etwa 50 mg) zugegeben. Am Ende war eine Gesamtmenge von 180 mg NaBH<sub>4</sub> eingesetzt worden. Die Lösung wurde dann dialysiert und lyophilisiert. Die Analyse erfolgte mittels Gelpermeationschromatographie (GPC), die Ausbeute lag bei ca. 15%.

## BEISPIEL 13

## Kopplung von HES-40 kD an Asparaginase

[0078] 3.0 g HES-40 kD wurden vollständig in Wasser (ca. 4 ml) gelöst. Dazu wurde eine Lösung von 80 mg Asparaginase (Sigma, Taufkirchen) in 6 ml 0.1 M Boratpuffer, pH 9.0, gegeben und solange gerührt bis die Reaktionsmischung klar war. Anschließend wurde die Temperatur auf 37°C erhöht und nach 2 h ca. 50 mg NaBH<sub>3</sub>CN zugegeben. Dieser Reaktionszyklus wurde noch 3 x wiederholt. Zur Aufarbeitung des Produkts wurde die Reaktionsmischung gegen 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.4, dialysiert. Die Ausbeute an Kopplungsprodukt betrug ca. 61%, wobei ca. 73% der Asparaginaseaktivität wiedergefunden werden konnten.



## BEISPIEL 14

## Kopplung von HES-130 kD an humanes Interleukin-2 (IL-2)

[0079] 50 mg HES-130 kD wurden vollständig in Wasser (ca. 0.2 ml) gelöst. Dazu wurde eine Suspension von 0.25 mg humanes IL-2 (Sigma, Taufkirchen) in 0.2 ml 0.1 M Boratpuffer, pH 9.0, gegeben und solange gerührt, bis die Reaktionsmischung klar war (4 h). Im Abstand von je 4 h wurden jeweils 1 mg  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  zugegeben und weitergerührt. Nach weiteren 24 h Reaktionszeit wurde gegen 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.4, dialysiert und lyophilisiert. Die Ausbeute an Kopplungsprodukt betrug nach Analyse durch GPC ca. 42%.

## BEISPIEL 15

## Kopplung von HES-130 kD an Insulin

[0080] 4.0 g HES-130 kD wurden vollständig in Wasser (ca. 6 ml) gelöst. Dazu wurden 55 mg Insulin aus Rinderpankreas (Sigma, Taufkirchen) in 7.5 ml 0.1 M Boratpuffer, pH 9.0, gegeben und für ca. 24 h bei 37°C gerührt. Das Reduktionsmittel  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (60 mg in 30 ml) wurde über einen Zeitraum von 8 h langsam zugetropft. Anschließend wurde für weitere 24 h gerührt und die Reaktionsmischung durch Ultrafiltration (30 kD) von Salzen und nicht umgesetzten Reagentien befreit. Durch Lyophilisation wurde ein stabiles Kopplungsprodukt erhalten. Ca. 55% des eingesetzten Insulins wurden als HES-Konjugat wiedergefunden.

## Patentansprüche

1. Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugat, dadurch gekennzeichnet, dass die bindende Wechselwirkung zwischen dem Hydroxyalkylstärkemolekül und dem Protein auf einer kovalenten Bindung beruht, welche das Ergebnis einer Kopplungsreaktion zwischen (i) der endständigen Aldehydgruppe oder einer aus dieser Aldehydgruppe durch chemische Umsetzung hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls und (ii) einer mit dieser Aldehydgruppe oder daraus hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls reaktionsfähigen funktionellen Gruppe des Proteins ist, wobei die bei der Kopplungsreaktion unmittelbar resultierende Bindung gegebenenfalls durch eine weitere Reaktion zur oben genannten kovalenten Bindung modifiziert sein kann.
2. Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die aus der endständigen Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls durch chemische Umsetzung hervorgegangene funktionelle Gruppe eine der funktionellen Gruppen eines bifunktionellen Linkermoleküls ist, mit dem die endständige Aldehydgruppe umgesetzt wurde.
3. Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktionsfähige funktionelle Gruppe des Proteins eine der funktionellen Gruppen eines bifunktionellen Linkermoleküls ist, welches an das Protein gekoppelt wurde.
4. Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktionsfähige funktionelle Gruppe des Proteins durch rekombinante Veränderung der ursprünglichen Aminosäuresequenz in das Protein eingeführt wurde.
5. Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugat nach Anspruch 1, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die

kovalente Bindung das Ergebnis einer Kopplungsreaktion zwischen einer durch selektive Oxidation der endständigen Aldehydgruppe gebildeten Carboxylgruppe oder aktivierten Carboxylgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls und einer primären Aminogruppe oder Thiolgruppe des Proteins ist.

6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die kovalente Bindung eine Amidbindung ist, welche das Ergebnis einer Kopplungsreaktion zwischen einem durch selektive Oxidation der endständigen Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls gebildeten aktivierten Carboxylgruppe und einer primären Aminogruppe des Proteins ist.

7. Konjugat nach Anspruch 1, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die kovalente Bindung eine Aminbindung ist, welche das Ergebnis einer Kopplungsreaktion zwischen der endständigen Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls und einer primären Aminogruppe des Proteins unter Bildung einer Schiff'schen Base und der Reduktion der Schiff'schen Base zum Amin ist.

8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül ein Molekulargewicht im Bereich von etwa 4 bis etwa 1000 kD aufweist.

9. Konjugat nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül ein Molekulargewicht von etwa 4 bis etwa 50 kD aufweist.

10. Konjugat nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül ein Molekulargewicht von etwa 70 bis etwa 1000 kD aufweist.

11. Konjugat nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül ein Molekulargewicht von etwa 130 kD aufweist.

12. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül einen Substitutionsgrad von etwa 0,3 bis etwa 0,7 aufweist.

13. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül ein Verhältnis der  $\text{C}_2$ - zu  $\text{C}_6$ -Substitution von 8 bis 12 aufweist.

14. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül ein Hydroxyethylstärkemolekül ist.

15. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein eine regulatorische oder katalytische Funktion, eine Signalvermittlungs- oder Transportfunktion oder eine Funktion bei der Immunreaktion oder Auslösung einer Immunreaktion besitzt.

16. Konjugat nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein aus der Gruppe aus Enzymen, Antikörpern, Antigenen, Transportproteinen, Bioadhäsionsproteinen, Hormonen und Prohormonen, Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Cytokinen, Rezeptoren, Suppressoren, Aktivatoren, Inhibitoren oder einem funktionellen Derivat oder Fragment davon ausgewählt ist.

17. Konjugat nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Interferon, ein Interleukin, ein Serumprotein, z. B. Albumin oder ein Gerinnungsfaktor, Erythropoietin, Myoglobin, Hämoglobin, ein Plasminogenaktivator, BCGF, BDGF, EGF, FGF, NGF, PDGF, BDNF, CNTF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , ein Kolonie-stimulierender Faktor, ein BMP, Somatomedin, Somatotropin, Somatostatin, Insulin, Gonadotropin,  $\alpha$ -MSH, Triptorelin, Prolactin, Calcitonin,

Glucagon, ein Glucagon-ähnliches Peptid, z. B. GLP-1 oder GLP-2, Exendin, Leptin, Gastrin, Secretin, ein Integrin, ein Hypothalamushormon, z. B. ein ADH, Oxytocin, ein Liberin oder Statin, ein Schilddrüsenhormon, z. B. Thyroxin, Thyrotropin, Thyroliberin, ein Wachstumshormon, z. B. Human-Wachstumshormon, LH, FSH, ein Pigmenthormon, TNF- $\alpha$  oder TNF- $\beta$ , Hirudin, ein Lipoprotein oder Apo-Lipoprotein, z. B. Apo-B, Apo-E, Apo-L<sub>a</sub>, ein Oligolysin-Protein, ein RGD-Protein, ein Lektin oder Ricin, Bienengift oder ein Schlangengift, ein Immunotoxin, Ragweed-Allergen, Antigen B, ein Immunglobulin, oder ein Rezeptor für eines dieser Proteine oder ein funktionelles Derivat oder Fragment eines dieser Proteine oder Rezeptoren ist.

18. Konjugat nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein ein Enzym ist, welches aus einer Asparaginase, Arginase, Arginindeaminase, Adenosindeaminase, Glutaminase, Glutaminase-Asparaginase, Phenylalaninammoniumlyase, Tryptophanase, Tyrosinase, Superoxiddismutase, Endotoxinase, Catalase, Peroxidase, Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Thermolysin, einer Lipase, Uricase, Adenosindiphosphatase, Purinnukleosidphosphorylase, Bilirubinoxidase, Glucoseoxidase, Glucodase, Gluconat-oxidase, Galaktosidase, Glucocerebrosidase, Glucuronidase, Hyaluronidase, Gewebefaktor, einem Gewebepelaminogenaktivator, Streptokinase, Urokinase, einer MAP-Kinase, DNase, RNase, Lactoferrin, und funktionellen Derivaten oder Fragmenten davon ausgewählt ist.

19. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 18 sowie einen pharmazeutisch annehmbaren Träger und gegebenenfalls weitere Hilfs- und Wirkstoffe.

20. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 18 oder einer Zusammensetzung nach Anspruch 19 zur therapeutischen oder präventiven Behandlung von Menschen oder Tieren.

21. Verfahren zur Herstellung eines Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass in wässriger Lösung eine Kopplungsreaktion zwischen der endständigen Aldehydgruppe oder einer aus dieser Aldehydgruppe durch chemische Umsetzung hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls und einer mit dieser Aldehydgruppe oder daraus hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls reaktionsfähigen funktionellen Gruppe des Proteins durchgeführt wird und die bei der Kopplungsreaktion unmittelbar resultierende Bindung gegebenenfalls durch eine weitere Reaktion modifiziert wird.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium der Kopplungsreaktion Wasser oder eine Mischung aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel ist, wobei der Wasseranteil der Mischung mindestens 80% beträgt.

23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass die endständige Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls durch selektive Oxidation in die entsprechende Carboxylfunktionalität überführt und diese anschließend unter Aktivierungsbedingungen in wässriger Lösung mit einer freien Amino- gruppe des Proteins umgesetzt wird, so dass das Hydroxyalkylstärkemolekül durch eine Amidbindung an das Protein gebunden wird.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die selektive Oxidation der Aldehydgruppe mit Iod oder Metallionen in wässriger basischer Lösung durchgeführt wird.

25. Verfahren nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopplungsreaktion in Gegenwart eines Carbodiimids durchgeführt wird.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Carbodiimid 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid (EDC) ist.

27. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass die endständige Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls mit einer freien Amino- gruppe des Proteins unter Bildung einer Schiff'schen Base gekoppelt wird und die gebildete Schiff'sche Base zum Amin reduziert wird, so dass das Hydroxyalkyl- stärke-molekül durch eine Aminbindung an das Protein gebunden wird.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass sowohl Kopplung als auch Reduktion in wässriger Lösung stattfinden.

29. Verfahren nach Ansprüchen 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass das Reduktionsmittel Natriumborhydrid, Natriumcyanoborhydrid oder ein organischer Borkomplex ist.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopplungs- und Reduktionsreaktionen gleichzeitig durchgeführt werden.

31. Verfahren zur Herstellung von selektiv an der endständigen Aldehydgruppe oxidierten Hydroxyalkyl- stärke, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydroxyalkylstärke in einem Molverhältnis von Iod zu HAS von 2 : 1 bis 20 : 1 in wässriger basischer Lösung umgesetzt wird.

32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass das Molverhältnis von Iod zu HAS etwa 5 : 1 bis 6 : 1 beträgt.

33. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass

a) eine Menge von Hydroxyalkylstärke in warmem destilliertem Wasser gelöst wird und etwas weniger als 1 Moläquivalent wässriger Iodlösung zugegeben wird,

b) NaOH-Lösung in einer molaren Konzentration, die etwa das 5-15fache der Iodlösung beträgt, langsam tropfenweise in Abständen von mehreren Minuten der Reaktionslösung zugegeben wird, bis die Lösung nach der Zugabe beginnt, wieder klar zu werden,

c) erneut etwas weniger als 1 Moläquivalent wässriger Iodlösung der Reaktionslösung zugegeben wird,

d) das Zutropfen der NaOH-Lösung wieder aufgenommen wird,

e) die Schritte b) bis d) solange wiederholt werden, bis etwa 5,5-6 Moläquivalente Iodlösung und 11-12 Moläquivalente NaOH-Lösung, bezogen auf die Hydroxyalkylstärke, zugegeben worden sind,

f) die Reaktion dann abgebrochen und die Reaktionslösung entsalzt und einer Kationenaustauschchromatographie unterworfen und das Reaktionsprodukt durch Lyophilisierung gewonnen wird.

34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der wässrigen Iodlösung um eine etwa 0,05-0,5 N Iodlösung handelt.

35. Verfahren nach Anspruch 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, dass die molare Konzentration der

NaOH-Lösung etwa das 10fache der Iodlösung beträgt.

36. Verfahren zur Herstellung von selektiv an der endständigen Aldehydgruppe oxidierter Hydroxyalkylstärke, dadurch gekennzeichnet, dass die HAS in wässriger alkalischer Lösung mit einem molaren Überschuss an stabilisierten Metallionen, ausgewählt aus  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und  $\text{Ag}^+$ -Ionen, oxidiert wird. 5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65